

Docket No. 220125US0X/rm

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Shuji KANEKO, et al.

GAU: 1614

SERIAL NO: 10/084,160

EXAMINER:

FILED: February 28, 2002

FOR: METHOD FOR SPECIFICALLY POTENTIATING N-TYPE Ca^{2+} CHANNEL ACTIVITY

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20531

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY

APPLICATION NUMBER

MONTH/DAY/YEAR

JAPAN

2001-258808

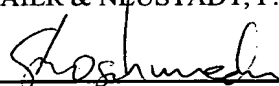
August 28, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon

Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

10/084,160



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年 8月28日

出願番号

Application Number:

特願2001-258808

[ST.10/C]:

[JP2001-258808]

出願人

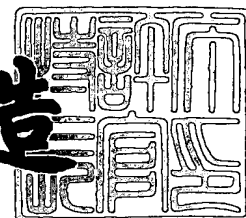
Applicant(s):

藤沢薬品工業株式会社
金子 周司

2002年 3月15日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3017837

【書類名】 特許願

【整理番号】 A4813

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成13年 8月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/42
C07D263/32

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工
業株式会社内

 【氏名】 松岡 信也

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区東奉行町伏見合同宿舎 1 1 4

 【氏名】 金子 周司

【特許出願人】

 【識別番号】 000005245

 【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【特許出願人】

 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区東奉行町伏見合同宿舎 1 1 4

 【氏名又は名称】 金子 周司

【代理人】

 【識別番号】 100080791

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 高島 一

 【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 006965

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715693

【プルーフの要否】 要

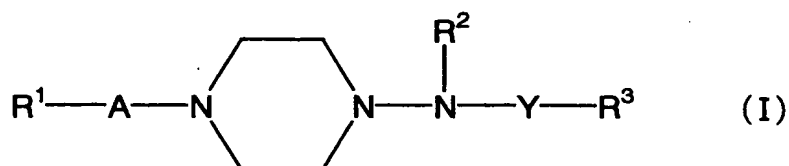
【書類名】 明細書

【発明の名称】 N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の式（I）：

【化1】



〔式中、R¹は低級アルキル、アリール、アル（低級）アルコキシ、または複素環基であり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、R²は水素原子または低級アルキルであり、R³はシクロ（低級）アルキル、アリールまたはアル（低級）アルキルであり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、Aは-CO-、-SO₂-または低級アルキレンであり、Yは-CO-、-SO₂-または-CONH-を表す。〕

で表される化合物、その塩、プロドラッグ、または溶媒和物を有効成分として含有する、N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強剤。

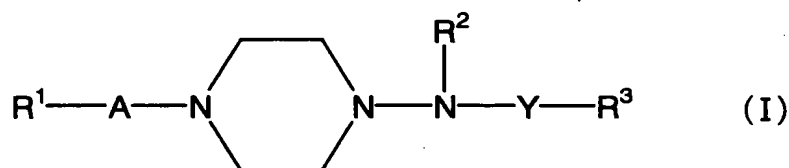
【請求項2】 前記式（I）で表される化合物が、N-（4-アセチル-1-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物である、請求項1記載の増強剤。

【請求項3】 N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強作用を有する化合物を有効成分として含有する、脳疾患予防・治療剤。

【請求項4】 前記脳疾患が、痴呆症、健忘症、精神分裂病、躁鬱病、脳梗塞、頭部外傷、ニコチン禁断症状、脊髄損傷、不安、頻尿、尿失禁、筋緊張性ジストロフィー、注意欠陥多動性障害、過剰昼間睡眠（ナルコレプシー）、パーキンソン病、自閉症、および心身症からなる群から選ばれる、請求項3記載の予防・治療剤。

【請求項5】 前記N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強作用を有する化合物が、以下の式（I）：

【化 2】



〔式中、 R^1 は低級アルキル、アリール、アル（低級）アルコキシ、または複素環基であり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、 R^2 は水素原子または低級アルキルであり、 R^3 はシクロ（低級）アルキル、アリールまたはアル（低級）アルキルであり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、Aは ---C---O--- 、 $\text{---SO}_2\text{---}$ または低級アルキレンであり、Yは ---C---O--- 、 $\text{---SO}_2\text{---}$ または ---CONH--- を表す。〕

で表される化合物、その塩、プロドラッグ、または溶媒和物である、請求項 3 または 4 記載の予防・治療剤。

【請求項 6】 前記式（I）で表される化合物が、N-（4-アセチル-1-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物である、請求項 5 記載の予防・治療剤。

【請求項 7】 神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} サブユニット発現細胞と被検薬物とを接触させる工程と、該細胞の膜電流を測定する工程と、神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} 非発現細胞と被検薬物とを接触させる工程と、該非発現細胞の膜電流を測定する工程と、前記発現細胞の膜電流と該非発現細胞の膜電流とを比較する工程とを包含する、N型 Ca^{2+} チャネル電流特異的増強作用を有する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 8】 前記神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} 非発現細胞が、神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1A} または α_{1E} を発現させた細胞である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 前記発現細胞が神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} サブユニットを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞である、請求項 7 または 8 記載の方法。

【請求項 10】 前記神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} 非発現細胞

が、神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1A} または α_{1E} を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞である、請求項 7～9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】 前記 N 型 Ca^{2+} チャネル電流特異的増強作用を有する化合物が、請求項 7～10 に記載のスクリーニング方法によって得られる化合物である、請求項 3 記載の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、N 型 Ca^{2+} チャネル電流特異的増強剤に関する。本発明はまた、N 型 Ca^{2+} チャネル電流特異的増強作用を有する化合物を有効成分として含有する、脳疾患予防・治療剤に関する。さらに本発明は、N 型 Ca^{2+} チャネル電流特異的増強作用を有する化合物のスクリーニング方法およびそのようなスクリーニング方法により得られた化合物を有効成分として含有する脳疾患予防・治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

カルシウムチャネル（本明細書中 Ca^{2+} チャネルとも表す）は、カルシウムイオンを選択的に透過させるイオンチャネルであり、電位依存性カルシウムチャネルとその他のカルシウムチャネルとが存在する。電位依存性カルシウムチャネルは細胞膜電位の脱分極により開くカルシウムチャネルであり、神経、筋、分泌細胞などの興奮性細胞に広く分布している。カルシウムチャネルは電位依存性、活性化・不活性化の速度、組織分布、および薬理学的性質の違いに基づいて、L 型、N 型、P 型、T 型などに分類される。カルシウムチャネルはいくつかのサブユニットからなり、チャネルとしての機能およびカルシウムに対する選択性や電位依存性などは α_1 サブユニットが担い、他のサブユニット（例えば N 型カルシウムチャネルでは、 β サブユニットおよび $\alpha_2\delta$ サブユニット）がそれを修飾すると考えられている。

【0003】

海馬は側頭葉の内側部に位置する組織であり、学習や記憶を司る領域であると

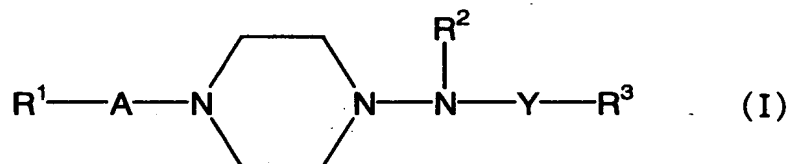
されている。海馬の入力ニューロンを短時間、高頻度で刺激すると、シナプス伝達効率がその後長期間にわたって上昇し続ける現象が観察される。この現象はシナプス伝達の長期増強(long-term potentiation) (以下、LTPとも言う)と呼ばれ、学習および記憶の細胞モデルとして認知されている(T.V.P. Bliss and G.L. Collingridge, Nature, 361, 31 (1993))。このLTPの機構およびそれと学習や記憶との関係をさらに解明することが望まれている。

【0004】

国際公開公報WO00/72834には、下記の構造(I)を有する化合物(以下、化合物(I)とも言う)が脳内ソマトスタチンの遊離を促進し、シナプス伝達長期増強作用を発現することによって、痴呆症等の治療剤として使用され得ることが開示されている：

【0005】

【化3】



【0006】

(式中、 R^1 は低級アルキル、アリール、アル(低級)アルコキシ、または複素環基であり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、 R^2 は水素原子または低級アルキルであり、 R^3 はシクロ(低級)アルキル、アリールまたはアル(低級)アルキルであり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、Aは-CO-、-SO₂-または低級アルキレンであり、Yは-CO-、-SO₂-または-CONH-を表す。))。

【0007】

化合物(I)は、記憶および学習の改善作用や海馬CA3領域におけるLTP亢進作用を有する。化合物(I)のLTP亢進作用のメカニズムとしてはコリン-ソマトスタチン性神経の活性化との関与が示唆されている。また、化合物(I)は海馬スライスの貫通線維-歯状回シナプスにおいてpopulation spike ampli

tude (P S A) を漸増させることが見出されている。しかし、化合物 (I) が上記したような作用をどのようなメカニズムで発揮するかは未だ解明されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な脳疾患予防・治療剤等の薬物の開発に有用な薬物の新規スクリーニング方法を開発し、当該スクリーニング方法を使用して新規薬物を提供することを目的とした。

【0009】

【課題を解決するための手段】

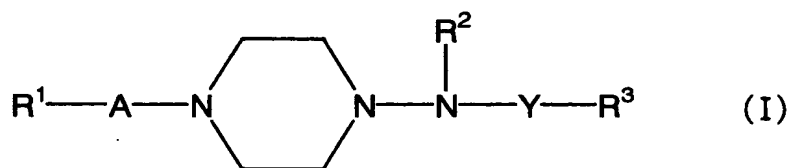
本発明者らは上記課題を鑑み鋭意研究した結果、ある特定の Ca^{2+} チャンネルの α_1 サブユニットに作用し、そのチャンネル特異的電流を増強させることによって、 Ca^{2+} の流入を促進させ、脳疾患の予防・治療に有用な作用を示すことを見出し、また、当該サブユニットを発現させた細胞の細胞膜電流の変化を指標として、脳疾患予防・治療剤として有用な化合物をスクリーニングできることを見出し、さらにその方法を確立して本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下の通りである。

【0010】

(1) 以下の式 (I) :

【0011】

【化4】



【0012】

〔式中、 R^1 は低級アルキル、アリール、アル（低級）アルコキシ、または複素環基であり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、 R^2 は水素原子または低級アルキルであり、 R^3 はシクロ（低級）アルキル、アリールまたはアル（

低級) アルキルであり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、Aは-CO-、-SO₂-または低級アルキレンであり、Yは-CO-、-SO₂-または-CONH-を表す。]

で表される化合物、その塩、プロドラッグ、または溶媒和物を有効成分として含有する、N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強剤。

(2) 式(I)で表される化合物が、N-(4-アセチル-1-ピペラジニル)-p-フルオロベンズアミド・一水和物である、上記(1)記載の増強剤。

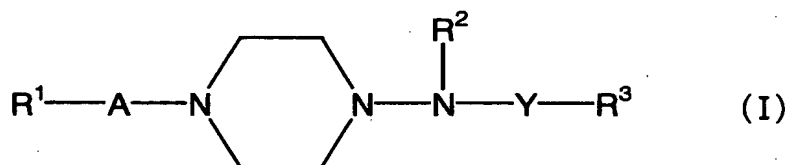
(3) N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強作用を有する化合物を有効成分として含有する、脳疾患予防・治療剤。

(4) 脳疾患が、痴呆症、健忘症、精神分裂病、躁鬱病、脳梗塞、頭部外傷、ニコチン禁断症状、脊髄損傷、不安、頻尿、尿失禁、筋緊張性ジストロフィー、注意欠陥多動性障害、過剰昼間睡眠(ナルコレプシー)、パーキンソン病、自閉症、心身症からなる群から選ばれる、上記(3)記載の予防・治療剤。

(5) N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強作用を有する化合物が、以下の式(I) :

【0013】

【化5】



【0014】

[式中、R¹は低級アルキル、アリール、アル(低級)アルコキシ、または複素環基であり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、R²は水素原子または低級アルキルであり、R³はシクロ(低級)アルキル、アリールまたはアル(低級)アルキルであり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、Aは-CO-、-SO₂-または低級アルキレンであり、Yは-CO-、-SO₂-または-CONH-を表す。]

で表される化合物、その塩、プロドラッグ、または溶媒和物である、上記(3)

または（４）記載の予防・治療剤。

（６）式（Ⅰ）で表される化合物が、N-（４-アセチル-１-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物である、上記（５）記載の予防・治療剤。

（７）神経型電位依存性カルシウムチャンネル α_{1B} サブユニット発現細胞と被検薬物とを接触させる工程と、該細胞の膜電流を測定する工程と、神経型電位依存性カルシウムチャンネル α_{1B} 非発現細胞と被検薬物とを接触させる工程と、該非発現細胞の膜電流を測定する工程と、前記発現細胞の膜電流と該非発現細胞の膜電流とを比較する工程とを包含する、N型 Ca^{2+} チャンネル電流特異的増強作用を有する化合物のスクリーニング方法。

（８）神経型電位依存性カルシウムチャンネル α_{1B} 非発現細胞が、神経型電位依存性カルシウムチャンネル α_{1A} または α_{1E} を発現させた細胞である、上記（７）記載の方法。

（９）発現細胞が神経型電位依存性カルシウムチャンネル α_{1B} サブユニットを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞である、上記（７）または（８）記載の方法。

（１０）神経型電位依存性カルシウムチャンネル α_{1B} 非発現細胞が、神経型電位依存性カルシウムチャンネル α_{1A} または α_{1E} を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞である、上記（７）～（９）のいずれかに記載の方法。

（１１）N型 Ca^{2+} チャンネル電流特異的増強作用を有する化合物が、上記（７）～（１０）に記載のスクリーニング方法によって得られる化合物である、上記（３）記載の予防・治療剤。

【 0 0 1 5 】

本発明において「N型 Ca^{2+} チャンネル電流特異的増強作用」とは、神経型電位依存性チャンネルであるN型カルシウムチャンネルの電流を増強する作用（ベースラインからの有意な変化）をいう。例えば、二電極膜電位固定法等の測定方法を用いて測定した場合には、ある濃度において統計学的に有意な程度の増強を惹起し、かつ、他の型のチャンネルには統計学的に有意な影響を与えない能力を示す。

【 0 0 1 6 】

本発明において「脳疾患」とは、痴呆症（例えば、老人性痴呆症、アルツハイマー型痴呆症、脳血管痴呆症、脳外傷後痴呆症、脳腫瘍に伴う痴呆症、慢性硬膜下血腫に伴う痴呆症、正常圧水頭症に伴う痴呆症、髄膜炎痴呆症、パーキンソン病型痴呆症、等様々な病態に伴う痴呆症）、健忘症、精神分裂病、躁鬱病、脳梗塞、頭部外傷、ニコチン禁断症状、脊髄損傷、不安、頻尿、尿失禁、筋緊張性ジストロフィー、注意欠陥多動性障害、過剰昼間睡眠（ナルコレプシー）、パーキンソン病、自閉症、心身症等である。

当該作用を有する化合物の具体例としては、化合物（I）が挙げられ、その中でも特にN-（4-アセチル-1-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物が好ましい。

【0017】

式（I）における各定義を以下に説明する。

【0018】

本明細書中で用いられる「低級」とは、特に他に明記しない限り、炭素数1～6個を意味する。

【0019】

「低級アルキル」としては、直鎖または分枝鎖のもの、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられ、これらの中でもメチルが好ましい。

【0020】

「アリール」としては、フェニル、ナフチル、トリル、キシリル、メシチル、クメニルなどが挙げられ、これらの中でもフェニルおよびナフチルが好ましい。

【0021】

「アル（低級）アルコキシ」としては、ベンジルオキシ、フェネチルオキシ、フェニルプロポキシ、ベンズヒドリルオキシ、トリチルオキシなどが挙げられる。

【0022】

「複素環基」としては、窒素原子、酸素原子または硫黄原子などのヘテロ原子を少なくとも1個含む飽和または不飽和の単環式または多環式基が挙げられる。

【 0 0 2 3 】

上記「複素環基」の好適な例としては、窒素原子 1～4 個を含む 3～8 員、より好ましくは 5～6 員の不飽和複素単環式基、例えば、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピリジル N-オキサイド、ピリミジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、トリアゾリル、テトラジニル、テトラゾリルなど；窒素原子 1～5 個を含む不飽和縮合複素環式基、例えば、インドリル、イソインドリル、インドリジニル、ベンズイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、インダゾリル、ベンゾトリアゾリルなど；酸素原子 1～2 個および窒素原子 1～3 個を含む 3～8 員の不飽和複素単環式基、例えば、オキサゾリル、イソキサゾリル、オキサジアゾリルなど；酸素原子 1～2 個および窒素原子 1～3 個を含む 3～8 員の飽和複素単環式基、例えば、モルホリノ、シドノニルなど；酸素原子 1～2 個および窒素原子 1～3 個を含む不飽和縮合複素環式基、例えば、ベンゾキサゾリル、ベンゾキサジアゾリルなど、硫黄原子 1～2 個および窒素原子 1～3 個を含む 3～8 員の不飽和複素単環式基、例えば、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリルなど；硫黄原子 1～2 個を含む 3～8 員の不飽和複素単環式基、例えば、チエニルなど；硫黄原子 1～2 個および窒素原子 1～3 個を含む不飽和縮合複素環式基、例えば、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリルなど；酸素原子 1 個を含む 3～8 員の不飽和複素単環式基、例えば、フリルなど；硫黄原子 1～2 個を含む不飽和縮合複素環式基、例えば、ベンゾチエニルなど；酸素原子 1～2 個を含む不飽和縮合複素環式基、例えば、ベンゾフラニルなどが挙げられる。

【 0 0 2 4 】

「シクロ（低級）アルキル」としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルなどが挙げられる。

【 0 0 2 5 】

「アル（低級）アルキル」としては、ベンジル、フェネチル、フェニルプロピル、ベンズヒドリル、トリチルなどが挙げられる。

【 0 0 2 6 】

「低級アルキレン」としては、メチレン、エチレン、プロピレン、ペンタメチ

レン、ヘキサメチレンなどが挙げられる。

【0027】

前記した、低級アルキル、アリール、アル（低級）アルコキシ、複素環基、シクロ（低級）アルキル、およびアル（低級）アルキルは、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）で置換されていてもよい。

【0028】

上記増強作用を有する化合物を有効成分として含有する薬剤を用いて、予防・治療されるべき脳疾患としては、N型Ca²⁺チャンネル電流を増強することによって、その症状が予防または緩解される疾患であれば特に限定されないが、特に、痴呆症、健忘症、精神分裂病、躁鬱病、脳梗塞、頭部外傷、ニコチン禁断症状、脊髄損傷、不安、頻尿、尿失禁、筋緊張性ジストロフィー、注意欠陥多動性障害、過剰昼間睡眠（ナルコレプシー）、パーキンソン病、自閉症、心身症の予防・治療に本発明の薬剤は有効である。

【0029】

本発明のN型Ca²⁺チャンネル電流特異的増強剤、N型Ca²⁺チャンネル電流特異的増強作用を有する化合物を有効成分として含有する脳疾患予防・治療剤（以下増強剤および予防・治療剤を合わせて本発明の薬剤とも言う）は、直腸投与、吸入、点鼻、点眼、外用（局所）、経口もしくは非経口（皮下、静脈内および筋肉内を含む）等の投与、脳髄、脊髄液、脳腔内等の患部への直接投与、または吸入に適した有機もしくは無機の担体または賦形剤とともに含有する固形、半固形もしくは液状の剤形で投与することができる。

【0030】

本発明の薬剤はまた、例えば、錠剤、ペレット、トローチ、カプセル、坐剤、クリーム、軟膏、エアゾール、吸入用粉末剤、液剤、乳剤、懸濁剤、その他の使用に適した剤形に用いられる慣用の製薬上許容される実質的に無毒性の担体または賦形剤とともに配合することができる。さらに、必要に応じて助剤、安定化剤、増粘剤、着色料、および香料を配合することもできる。

【0031】

本発明の薬剤は、当該分野で公知の製剤技術を用いて製造することができる。

本発明の薬剤はまた、必要に応じ、当該分野で公知の方法を用いて、その塩、プロドラッグ、溶媒和物にすることができる。

【 0 0 3 2 】

本発明において「塩」とは、好ましくは、生物学的に許容される通常無毒の塩であり、無機酸付加塩（例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等）、有機カルボン酸もしくはスルホン酸付加塩（例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸等）との塩等の酸付加塩が例示される。

【 0 0 3 3 】

本発明において「プロドラッグ」とは、好ましくは、生体内において酵素や胃酸等による反応によりN型Ca²⁺チャネル電流特異的増大作用を有する化合物に変換する化合物をいう。

【 0 0 3 4 】

本発明において「溶媒和物」とは、例えば、包接化合物（例えば水和物等）である。

【 0 0 3 5 】

本発明の薬剤を動物（ヒトを含む）に適用する場合、静脈内（輸液に含有させる方法も含む）、筋肉内または経口で投与するのが好ましい。

【 0 0 3 6 】

本発明の薬剤は、対象とする症状の経過または状態に、所望の効果を生じさせる量を製剤に少なくとも含有させればよい。

【 0 0 3 7 】

本発明の薬剤の投与量および投与方法は、化合物の種類、予防および／または治療を受けるべき各患者の年齢および条件によっても変動し得るが、例えば、有効成分である化合物（I）の量で、経口投与で患者の体重1kgあたり1日量として0.01～10mgを投与すればよく、前記疾患の予防・治療のためには、1日に1回～数回投与すればよい。

【 0 0 3 8 】

本発明は、細胞膜電流、好ましくは、神経型電位依存性カルシウムチャネルの各 α_1 サブユニット特異的な膜電流を測定することを特徴とする、N型 Ca^{2+} チャネル電流特異的増強作用を有する化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0039】

本発明における「神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} サブユニット発現細胞」としては、神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} サブユニットを発現している細胞であれば特に限定されず、天然のものでも人工のものでもよい。例えば、人工的に神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} サブユニットを発現させた細胞としては、組換え動物細胞が挙げられ、より詳細には、予めコラゲナーゼ処理によって濾胞を取り除き、mRNA（例えば、市販品、新鮮組織より精製した polyA+RNA、クローン化された cDNA を鋳型にして合成した単一 cRNA、cDNA ライブラリーの一部より合成した cRNA）を注入あるいは cDNA の核内注入等により α_{1B} サブユニットを発現させたアフリカツメガエル組換え卵母細胞が挙げられる。

【0040】

また本発明における「神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} 非発現細胞」としては、神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} サブユニットを発現していない細胞であれば特に限定されず、好ましくは α_{1B} 以外の α_1 サブユニット、例えば α_{1A} や α_{1E} 等を発現している細胞である。これらの細胞は天然のものでも人工のものでもよい。例えば、人工的な細胞としては、組換え動物細胞が挙げられ、より詳細には、予めコラゲナーゼ処理によって濾胞を取り除き、上記したような mRNA を注入して α_{1A} または α_{1E} 等 α_{1B} 以外のサブユニットを発現させたアフリカツメガエル組換え卵母細胞が挙げられる。

【0041】

発現細胞および／または非発現細胞において、好ましくは α_1 サブユニット以外のカルシウムチャネル構成サブユニットである β サブユニットや $\alpha_2\delta$ サブユニットを共発現させて、カルシウムチャネルを再構成させる。

【0042】

本発明において、「被検薬物」としては、特に限定されず、N型 Ca^{2+} チャネ

ル電流特異的増強作用を有するか否かを判断したい薬物であればいかなる薬物をも被検対象物とすることができるが、本発明の方法は特に、化合物（I）に類似した作用を示す可能性がある薬物をスクリーニングするのに適している。

【 0 0 4 3 】

本発明において「接触させる」とは、上記したような細胞と被検薬物とを物理的または化学的に接触させることを意味し、例えば、被検薬物を溶解した溶媒中に該細胞を懸濁させるかまたは該細胞を懸濁した溶媒中に被検薬物を溶解させることによってこれらを接触させることができる。当該溶媒としては、水、ジメチルスルホキシド（DMSO）、人工脊髄液等の溶媒を挙げることができる。

【 0 0 4 4 】

「膜電流」とは、細胞膜を横切って流れる電流であり、生体膜の脂質二重層部分の持つ膜容量を充電するための容量性電流とイオンチャネルを流れるイオン電流の和となるものであるが、本発明では、好ましくは、 Ca^{2+} チャネルのみを対象とし、該チャネルのみを発現させた細胞を用いるため、本発明でいう膜電流におけるその増減は、 Ca^{2+} イオンチャネルを通過することによって発生するイオン電流の増減に対応する（容量性電流は一定）。

【 0 0 4 5 】

本発明において「膜電流の測定」は、膜電流の変化を評価し得る任意の方法を用いて膜電流を測定することによって達成され得る。例えば、二電極膜電位固定法、Cut-Open法、パッチクランプ法等の測定法が挙げられる。具体的には、記録液（例えば、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ca^{2+} のような Ca^{2+} チャネル透過性を示す二価カチオン）を満たしたチャンバーに2本のガラス電極を浸漬し、これに電流を加えることによって測定することができる。

【 0 0 4 6 】

さらに、本発明の1実施態様においては、例えば、

①アフリカツメガエル卵母細胞に、ウサギ電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} 、 $\alpha_{2\delta_1}$ および β_{1b} のmRNAを混合して注入することによって神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} サブユニット発現細胞を調製し、これと被検薬物とを接触させ、該細胞の膜電流を測定する；

②アフリカツメガエル卵母細胞に、ウサギ電位依存性カルシウムチャネル α_{1A} または α_{1E} 、ならびに $\alpha_{2\delta_1}$ および β_{1b} のmRNAを混合して注入することによって神経型電位依存性カルシウムチャネル α_{1B} 非発現細胞を調製し、これと被検薬物とを接触させ、該細胞の膜電流を測定する；

③発現細胞の膜電流と非発現細胞の膜電流とを比較する、
ことによって、N型 Ca^{2+} チャネル電流特異的増強作用を有する化合物をスクリーニングすることができる。

【0047】

以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の好ましい実施態様を例示するに過ぎず、本発明はこれらにより何ら限定されない。

【0048】

【実施例】

卵母細胞の調製

アフリカツメガエルの腹腔内より卵巣を摘出し、コラゲナーゼ処理によって卵母細胞を覆う濾胞を除去した (Kinoshita et al., J. Biol. Chem. 276, 28731-28738 (2001))。ウサギ電位依存性カルシウムチャネルサブユニット α_{1A} 、 α_{1B} または α_{1E} とヒト $\alpha_{2\delta_1}$ と β_{1b} との3種類の組み合わせのmRNA (Kinoshita et al., 上述, に記載の方法と同じかまたはそれに準じた方法を用いて作製、入手した) を16.7ngずつ混合した後、これを卵母細胞に注入しModified Birthing's saline (88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM $CaCl_2$, 0.33mM $Ca(NO_3)_2$, 0.82mM $MgSO_4$, 2.4mM $NaHCO_3$, 7.5mM Tris-HCl, 10U/ml ペニシリン, 10 μ g/ml ストレプトマイシン, pH 7.6) 中で22℃2~4日間培養した。

【0049】

電気生理学的測定

上記によって調製した卵母細胞を Ba^{2+} 含有記録液 (10mM $Ba(OH)_2$, 90mM NaOH, 2mM KOH, 5mM Hepes, 0.3mM ニフルム酸、メタンスルホン酸でpH 7.4) で満たしたチャンバーに置き、2本のガラス電極で-80mVに固定した。30秒間隔で0mVへのテストパルス (200ms幅) を加えて、全細胞膜電流を測定した。その2回に1回は40ms前に終わる+100mVの脱分極プレパルス (1

0 0 m s 幅) を加え、 Ca^{2+} チャンネルに結合して開口を抑制している G タンパク質 $\beta \gamma$ サブユニットの影響を取り除いた。(Kinoshita et al., 上述) Ba^{2+} 電流 (I_{Ba}) を Ca^{2+} チャンネル電流と見なし、リーク電流は P / 4 プロトコルにより補正した。N - (4 - アセチル - 1 - ピペラジニル) - p - フルオロベンズアミド・一水和物 (以下被検薬物とも言う) を Ba^{2+} 含有記録液に溶解させて適用した。

【0 0 5 0】

<結果>

図 1 に、 α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1E} チャンネルをそれぞれ発現させた細胞における、0 m V、2 0 0 m s のテストパルスを加えたときの反応を示す。1 0 0 n M の被検薬物適用時、 α_{1A} 、 α_{1E} チャンネルを発現させた細胞ではほとんど被検薬物の作用は観察されなかった。一方、 α_{1B} チャンネルを発現させた細胞において電流の増大が観察され、その作用は再び basal 溶液に戻し、洗浄すると、洗浄後まもなく処置前と同程度に戻った。各チャンネルの最大振幅に対する被検薬物の作用を薬物濃度を変えて観察した結果を図 2 に示す。

【0 0 5 1】

また、 α_{1B} チャンネルに対する被検薬物の作用をより詳細に検討するため、脱分極刺激電位を変化させた時の電位依存性、定常不活性状態における電位依存性についても検討を行ったが、1 0 0 n M の被検薬物では α_{1B} チャンネルの活性化および不活性化の電位依存性にはほとんど影響を及ぼさなかった。

【0 0 5 2】

これらの結果から、被検薬物が、 α_{1B} チャンネルの電位依存性にはほとんど影響を及ぼさず、 α_{1B} チャンネル特異的な比較的濃度域の狭い電流増幅の増大作用を有することがわかった。

【0 0 5 3】

【発明の効果】

痴呆症、健忘症といった脳疾患の予防・治療に有用な N 型 Ca^{2+} チャンネル電流特異的増強剤が提供され、また、化合物 (I) に類似の作用を有する薬物のスクリーニングに特に有用な N 型 Ca^{2+} チャンネル電流特異的増強作用を有する化合物

のスクリーニング方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

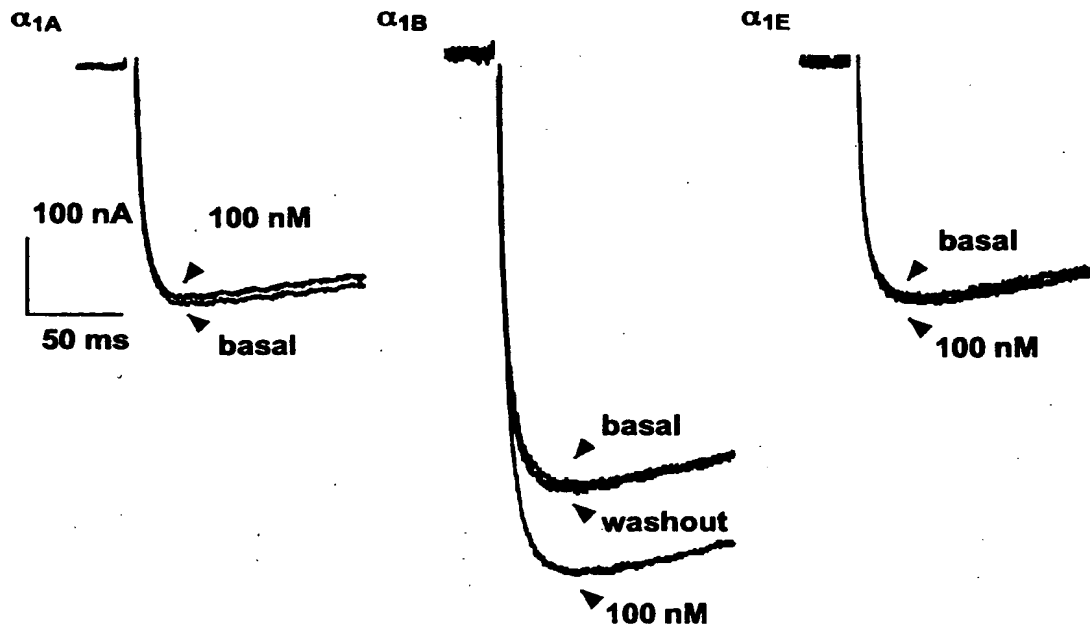
α_{1A} 、 α_{1B} および α_{1E} チャネル電流に対するN-（4-アセチル-1-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物の影響を示す。N-（4-アセチル-1-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物適用前（basa l）、100 nMのN-（4-アセチル-1-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物適用時（細胞に薬液が触れてから90秒での）、洗浄後30秒での電流の軌跡を示した。

【図 2】

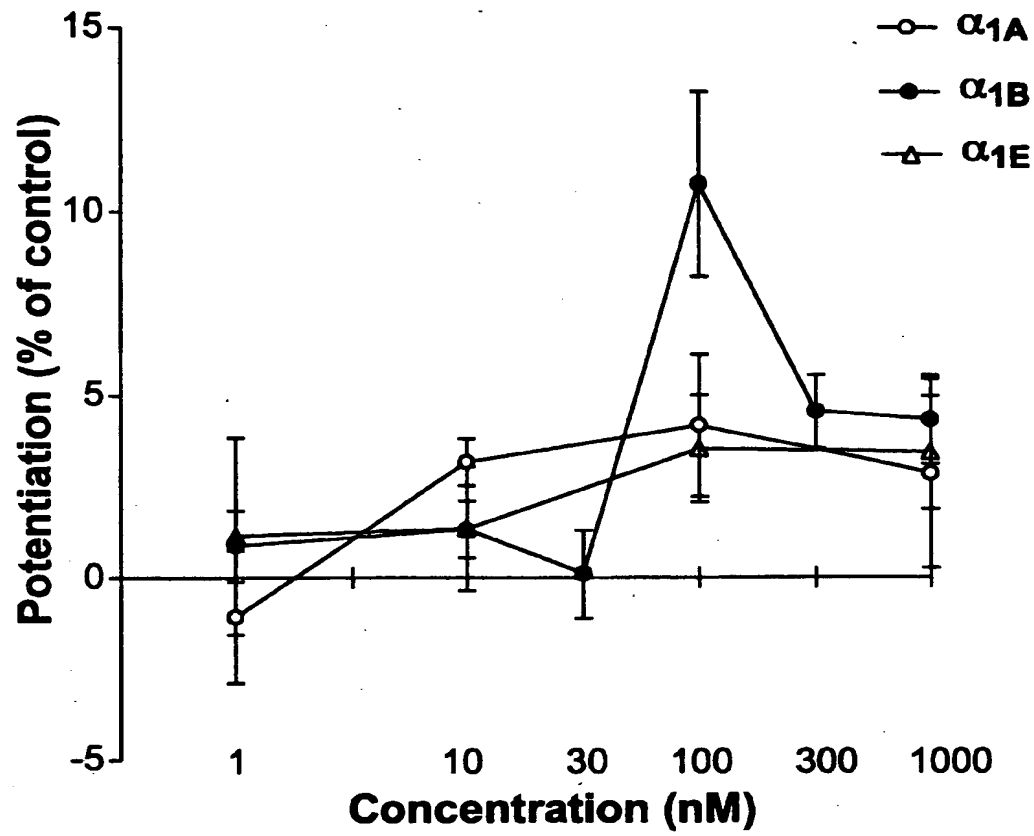
神経細胞の Ca^{2+} チャネルに対するN-（4-アセチル-1-ピペラジニル）-p-フルオロベンズアミド・一水和物の影響の濃度と応答との関係を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



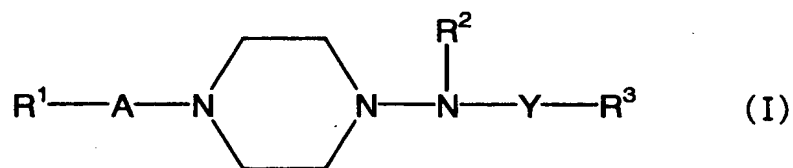
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 痴呆症、健忘症といった脳疾患の予防・治療に有用なN型Ca²⁺チャネル電流特異的増強剤、ならびに、化合物(I)に類似の作用を有する薬物のスクリーニングに特に有用なスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 以下の式(I)：

【化1】



〔式中、R¹は低級アルキル、アリール、アル（低級）アルコキシ、または複素環基であり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、R²は水素原子または低級アルキルであり、R³はシクロ（低級）アルキル、アリールまたはアル（低級）アルキルであり、以上の基はハロゲンで置換されていてもよく、Aは－C(=O)－、－SO₂－または低級アルキレンであり、Yは－C(=O)－、－SO₂－または－CONH－を表す。〕

で表される化合物、その塩、プロドラッグ、または溶媒和物を有効成分として含有する、N型Ca²⁺チャネル電流特異的増強剤。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号 [000005245]

1. 変更年月日 1990年 8月17日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
氏 名 藤沢薬品工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501340454]

1. 変更年月日 2001年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区東奉行町伏見合同宿舍114

氏 名 金子 周司